

⑪ 公開特許公報(A)

昭63-39576

⑫ Int. Cl.

C 12 N 1/16
15/00

識別記号

庁内整理番号

K-5712-4B
7115-4B

⑬ 公開 昭和63年(1988)2月20日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全10頁)

⑭ 発明の名称 酵母の遺伝子修飾方法

⑮ 特 願 昭62-159504

⑯ 出 願 昭62(1987)6月26日

優先権主張 ⑰ 1986年6月27日 ⑱ イギリス(GB) ⑲ 8615701

⑳ 発 明 者 エドワード ヒンクリ イギリス国 ノッティンガム、バートン ジョイス、ラム
ソフエ ブライ レーン、16

㉑ 発 明 者 クリステイン ジェー イギリス国 エルイー4 7 ジョージー ライセスクシャ
ン フレミング ー、ウエスト ハンバーストーン、ハンティンドン ロード、41

㉒ 出 願 人 デルタ バイオテクノ イギリス国 デーイー14 1 ジェイゼット バートン
ロジャー リミテッド オン トレント ハイ ストリート、137

㉓ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外2名

明細書の序文(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

酵母の遺伝子修飾方法

2. 特許請求の範囲

1) 相同な 2 μm プラスミド DNA 配列の 2 コピーが相互に直列方向に連結し、目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列を含む組込みベクターで酵母を先ず形質転換し、次に得られる形質転換酵母から該 DNA 配列を組みこんでいるが該ベクターは含有しない内因性 2 μm プラスミドを含有する細胞を単離することより成る、目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA を内因性 2 μm プラスミドに取り込むことによる酵母の遺伝的修飾方法。

2) 組込みベクターが、目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列から直列方向の該相同配列により隔てられる DNA 配列をも含有する特許請求の範囲第1)項記載の方法。

3) 該外来 DNA 配列がベクター中でのベクターの増殖を助け、酵母に対して異種の DNA 配列であ

る特許請求の範囲第2)項記載の方法。

4) 該ベクターが目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列から直列方向の相同配列により隔てられることのない選択マーカー DNA 配列をも含有する特許請求の範囲第1)項記載の方法。

5) 選択マーカー DNA 配列が選択に対する耐性をコードする遺伝子である特許請求の範囲第4)項記載の方法。

6) 該ベクターが酵母の 2 μm プラスミド固有の複製開始点を含有する特許請求の範囲第1)項記載の方法。

7) 目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列がヒト血清アルブミンまたはその誘導体をコードする特許請求の範囲第1)項記載の方法。

8) 直列方向の相同な 2 μm プラスミド配列の夫々が酵母の内因性 2 μm プラスミドからの DNA の EcoRI 部位および XbaI 部位で隔まれる 703 塩基対より成る特許請求の範囲第1)項記載の方法。

9) 酵母が醸造酵母である特許請求の範囲第1)項記載の方法。

10) 相同な 2 μm プラスミド配列が直列方向に 2 コピー、酵母以外でのプラスミド増殖を助ける DNA 配列およびプラスミド増殖を助ける該 DNA 配列から直列方向の該相同配列により隔離される目的の異種蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列を含有する 2 μm プラスミドベクター。

11) 目的の蛋白質またはペプチドをコードする DNA 配列から直列方向の相同配列により隔離されない選択マーカー DNA をも含有する特許請求の範囲第 10) 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

12) 選択マーカー DNA 配列が銅に対する耐性をコードする遺伝子である特許請求の範囲第 11) 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

13) 酵母の 2 μm プラスミド固有の複製開始点を含有する特許請求の範囲第 10) 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

14) 目的の異種蛋白質またはペプチドがヒト血清アルブミンまたはその誘導体である特許請求の範囲第 10) 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

15) 直列方向の相同な 2 μm プラスミド配列の欠

失が酵母固有の 2 μm プラスミドからの DNA の *NotI* 部位および *XbaI* 部位に囲まれた 703 塩基対より成る特許請求の範囲第 10) 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

3 発明の詳細な説明

本発明は醸造酵母の遺伝子操作に関する。

組換え DNA を形質転換法によつて酵母実験菌株に導入することはよく行なわれており、1970 年代後期に始めてこの現象が報告されて以来 (Hinnen ら, 1978 年; Beggs, 1978 年) 高度に、かなり進歩してきた。酵母の形質転換に通常使用されるベクターは二つのタイプに分類される:

(i) 複製ベクター、即ち、DNA 複製の機能的開始点が存在するため、酵母の染色体 DNA とは独立に自己維持を伴うことができるベクター、および

(ii) 複製のため、またさらに増殖中での組換え DNA の維持のために染色体 DNA との組換えを必要とする組込みベクターである。複製ベクターはさらに次のように分類できる。

(a) DNA 複製の開始点が酵母固有の 2 μm プラスミドに由来する 2 μm プラスミドベクター。

(b) 「見かけ」の複製開始点が酵母の染色体 DNA に由来する自律複製ベクター (ARS)、および

(c) 上記 DNA 複製開始点の一つに加え、動物体を保有することが知られている酵母染色体 DNA の配列を含有する動物体プラスミド (CDN) である。

上記ベクターのいずれかで酵母を効率よく形質転換するためには、組換え DNA を保有する形質転換株を同定する選択マーカーを分装酵母細胞に賦与することが必要である。実験用酵母ではベクター DNA に、使用する受容菌株の栄養要求性を補足する遺伝子を組み込むことによりこれが達成できる。倍數体であり、栄養要求性を示さない醸造酵母を形質転換するためには、抗性選択遺伝子に基づく選択系を利用する必要がある。この点から、複製 2 μm プラスミドベクターは次のような物質に対する耐性を伴う遺伝子を保有することが報告されている。

(i) 抗生物質、例えば G418 (Jininez ら, 1980 年; Webster ら, 1983 年)、ハイグロマイシン B (Ortiz ら, 1983 年)、クロタムブエニコール (Cohen ら, 1980 年)、および

(ii) 毒性物質、例えば、除草剤スルホメチオンメチル (酵母 α -ブセット乳糖合成酵素遺伝子 *ILV-2* の変異により耐性) (Falcó ら, 1985 年) および銅 (酵母の *CUP-1* 遺伝子を介して耐性) (Henderson ら, 1985 年)。

複製型プラスミドで酵母を形質転換すると全ての場合、形質転換株集団の安定性は細胞増殖の非選択条件下で低い。即ち、2 μm 型ベクターは選択なしで一回の分裂につきおよそ 1-5 パーセントの頻度で受容酵母実験菌株から欠失していく (Beggs, 1978 年; Broach ら, 1979 年; Gerbault ら, 1979 年; Struhl ら, 1979 年)。

このようなプラスミドの酵母に対する相対的安定性は酵母宿主に依る。この点で、銅耐性を保有

する2 μ m 型プラスミドは、醸造酵母で一回の分裂につきおよそ0.18%の頻度で失われることがわかつている(Hinchliffe および Daubney, 1986年)。受容酵母がプラスミドの安定性に影響するのと同じように、プラスミド自体の性質も重要な役割を有する。例えば、ARSプラスミドは細胞分裂当り10%以上の頻度で失われる(Kikuchi, 1983年)。細胞の連続増殖後も形質転換表現型を安定に維持するためにはプラスミドの選択を維持する必要がある。実験室酵母形質転換株の場合には受容酵母株が要求する栄養素を欠損する最少増地で通常選択する必要があるため細胞増殖に用いる増地の性状に制限がかかる。しかし、醸造酵母の場合通常の生育増地であるホップ入りビール麦芽汁に抗生物質、或いは銅のような毒性物質を添加することは、それらが腐敗でありまた発酵の主要基物であるビールの質に悪い影響を及ぼすため、実用的でなくまた望ましくない。

非選択生育条件下で酵母に於ける組換え遺伝子

Biotechnology International Inc.)。この系は醸造酵母での遺伝子安定性を与えるが、組換えDNAの高コピー維持はせず、醸造酵母の本質的な低形質転換効率のため実施するのにより困難である。

本発明は酵母、特に醸造酵母の2 μ m 型組換えプラスミドによる形質転換の方法を提供する。醸造酵母の形質転換はプラスミド上に酵母のCUP-1遺伝子が存在することにより銅耐性の転換株を選択できることで行なう事が可能であるが、抗生物質耐性を含むどんな優性選択マーカーをも使用することができ、実際に目的のペプチド産物をコードする遺伝子とは異なる別のマーカー遺伝子を使用することができる。組換えの「目的遺伝子」を安定に維持するためには遺伝子を醸造酵母の内生2 μ m プラスミド内の部位に遺伝子組換えにより組込むことを行なう。本プラスミドは今まで調べられた限り全ての所有酵母菌株に存在する(Hinchliffe および Daubney, 1986年)。内生2 μ m プラスミドの普遍的存在はこのプラ

の維持を確保する一つの方法としては受容体に導入された時ベクターと染色体DNAの相同配列での遺伝子組換えによる宿主染色体への組込みを起す組込み酵母ベクターの使用がある。しかし、そのようなベクターは非常に低い形質転換効率を有し、 μ g のDNA当り約1-10%の転換体しか得られない(Hindenら, 1978年; Hicksら, 1979年)。この頻度は形質転換するDNAをDNA相同性領域で切断するような制限エンドヌクレアーゼで切断することにより高い組換え性分子を形成して高めることが出来る(Hicksら, 1979年)。この現象は、組込みベクターによる形質転換効率を制限する主要因子がDNA組込みではなく、むしろ組換えにあることを示唆している。この事は、組換えのための目的DNA配列が宿主細胞の代謝に影響を与えない領域にさえあれば組込みベクター系の醸造酵母への応用を制限しない。上述の原理に基づき、組込み酵母ベクターが最近醸造酵母に用いられている(酵母ベクター、ヨーロッパ特許公報163,491)。

プラスミドが醸造酵母中で見かけ上非選択生育下で多くの世代を経ても安定に維持されることを示す。従って理想的には、目的遺伝子の組込みを2 μ m プラスミド中の内生2 μ m プラスミドの遺伝的安定性に悪影響を及ぼさない部位に行なう事が必要である。

酵母の2 μ m プラスミドは6318塩基対の環状DNA分子で、全ヌクレオチド配列が決定されている(Hartley および Donelson, 1980年)。本プラスミドは醸造酵母(Alg1ら, 1984年; Hinchliffe および Daubney, 1986年)を含む*Saccharomyces cerevisiae*のほとんどの菌株(Clark-Walker および Miklos, 1974年)に細胞当りおよそ50-100コピー存在する。本プラスミドは非メンデル様式で遺伝し(Livingston, 1977年)、そのため細胞中で細胞質性と考えられている。しかし、本プラスミドが核内に存在することを示す多くの重要なデータもある(Nelson および Pangman, 1979年; Livingston および Hanne, 1979年; Seligy

ら、1980年；Takanoら、1980年；Sigurdsonら、1981年）。本プラスミドの重要な特徴としては、二つの逆転したくり返し（長さが599塩基対）が存在し、このため分子が二つの特異な領域に分離されていることである。逆くり返ししでの分子内組換えの結果、一方の特異領域が他方に対して遊離し、生体内でAおよびBと呼ばれる二つのプラスミド構造体の混合を形成する（Bergs, 1978年）。二つの逆くり返ししでの組換えは、プラスミド自体に存在するFLPと呼ばれる遺伝子の産物により仲介される。FLP遺伝子は逆くり返し領域での高頻度組換えを仲介できる蛋白質をコードする。

驚くことに、「目的の遺伝子」が内生2 μ プラスミドの遺伝的安定性に無影響を及ぼすことなく2 μ プラスミド内に組込まれることを見つけた。

本発明によると、目的の蛋白質またはペプチドをコードするDNA配列を酵母固有の2 μ プラスミド内に組込むことによる酵母の遺伝的修飾方法

でのプラスミドの複製を助けるDNA配列、およびプラスミドの複製を助ける該DNA配列から直列方向の該相同配列で覆てられた目的の異種蛋白質またはペプチドをコードするDNA配列とから成る2 μ プラスミド組込みベクターを提供する。

本発明の方法では、組込みは組換えを通して起り、ベクターの相同DNAくり返し配列の間に含まれていない残りのベクターDNAを除外して組換え遺伝子（目的のDNA配列）の組込みを行なう。本方法では、「目的の遺伝子」のみが酵母、例えば醸造酵母、中で非選択生育条件下において何世代も安定に維持され、それにより余分なDNA配列で起り得る酵母の技術上の性状或いは酵母により生産される生成物であるビールの風味および品質に対する悪影響を回避できる。

本発明はこの発明の真実性に依存してはいないが、本ベクターは酵母に導入されると相同DNAくり返し配列の間の分子内組換えが起り、それぞれ内生2 μ プラスミドに相同な一つのDNA配列を有する二つのプラスミド断片を生成すると考え

は。先ず相同な2 μ プラスミドDNA配列が相互に直列方向に位置する2コピーおよび該DNA配列を含有する組込みベクターで酵母を形質転換し、次に得られる転換体より、ベクターは含まないが目的のDNA配列を組込んだ酵母内生2 μ プラスミドを含有する細胞を単離することから成る。目的のDNA配列は組込みベクター内に該配列を導入できる例えばBamHI部位またはXbaI部位などの適当な制限酵素部位を介して組込まれる。ベクターは通常、無関係なDNA配列、即ち、酵母中でのプラスミドの複製に必要でなく、好ましくもないが、バクテリアまたは他の酵母以外の宿主微生物での複製のために好ましい配列を含有する。このようなDNA配列は目的の蛋白質またはペプチドをコードするDNA配列から直列方向の相同配列により覆てられる。好ましくはこの配列は酵母に対して外来性であつてバクテリア中でのベクターの複製を助ける配列である。

本発明はさらに、直列方向に相同な2コピーの2 μ DNA配列、通常は酵母に外来性で酵母以外

られている。これらの断片の一つが元のベクターが保有していた2 μ の複製開始点を有し、もう一方は最初ベクターのくり返し配列の間に存在した他のDNA配列を保有する。後者のプラスミド断片が酵母の内因性2 μ プラスミドと相同領域で組換えを起こし、酵母内生2 μ プラスミドと元のベクターの直列方向の二つの相同DNAくり返し配列の間に含まれていた目的のDNA配列を相同領域に挿入されて保有する安定な組込み体を生成する。

実際には「目的の遺伝子」は酵母にとり同種または多くの場合異種のいかなる組換え遺伝子でもよい。例えば、本発明はヒト血清アルブミン遺伝子を醸造酵母に安定に組込むために利用され、その結果、例えばホスホオグリセリン酸キナーゼプロモーター（PGK）のような酵母複製プロモーター、或いは例えばヨーロッパ特許出願No. 86303039.1、No. 2 012 897として公開の「Fermentation with an Inducible Gene Expression System」（Delta Biotechnology Ltd.）に記載される

GAL 1 0 / CYC 1 雜種プロモーター或いは英國特許出願 № 8 6 2 0 9 2 6 , 1 9 8 6 年 8 月 2 6 日 出願の「Yeast Promoter」(Delta Biotechnology Ltd.) に記載の GAL 1 0 / POK プロモーター (PAL) のような酵母調節プロモーターから該遺伝子が発現される。

本システムにより安定に組込むことの出来る他の遺伝子としては、醸造酵母で菌体外にグルコアララーゼ酵素を生産する *Saccharomyces*

diastaticus の DEX - 1 遺伝子および醸造酵母でエンドー 1 , 3 - 1 , 4 - β - グルカナーゼの生産を指示する *Bacillus subtilis* の β - グルカナーゼ遺伝子 (Hinchliffe および Box , 1 9 8 5 年) がある。異種遺伝子は先ず遺伝子修飾して遺伝子発現レベルを調節し、または遺伝子により生産が仲介される蛋白質が醸造酵母により菌体外に分泌されるようにする。

本発明の遺伝子組込み方法では、目的の遺伝子が高コピータで非選択生育条件下で安定に維持される。これは特にヨーロッパ特許出願

プラスミド pEHB 1 1 (ヨーロッパ特許出願 № 8 6 3 0 3 0 3 9.1 , 公開 № 2 0 1 2 3 9 , Fermentation with an Inducible Gene Expression System ; Delta Biotechnology Ltd. , に記載) をビール酵母菌株 NCYC 2 4 0 (エール酵母 - National Collection of Yeast Cultures , 英國ノリフジ , コルニーレーン) および B B 1 0 , 2 (ラガー酵母 - Bacc Yeast の所有菌株) に形質転換し、Hinchliffe および Daubney (1 9 8 6 年) に記載されるように耐銅性転換体を選択する。NCYC 2 4 0 (pEHB 1 1) は 1 9 8 4 年 1 2 月 1 2 日に英國ノリフジ NR 4 , 7 A U , コルニーレーンの National Collection of Yeast Cultures に NCYC 1 5 4 7 として登録されている。

形質転換株は耐銅性 (> 1 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) , β - ガラクトシダーゼ陽性 (M - 6 3 , 2 多 % α/β ガラクトースおよび X - gal 上で青 / 緑色、ヨーロッパ特許出願 № 8 6 3 0 3 0 3 9.1) および β - ラクタマーゼ陽性を確認する。形質転換株を 2

№ 8 6 3 0 3 0 3 9.1 (Fermentation with an Inducible Gene Expression System) に記載される方法を実施する際に有利である。それはこれらの条件下で目的遺伝子の発現は制御され、主要ビール発酵の工程中では発現されないが発酵後に誘導されるからである。目的遺伝子の高コピータを確保することにより発酵後に高レベルの誘導を達成することが可能で、従つて生産する異種蛋白質の量を増加できる。

Saccharomyces diastaticus DEX - 1 遺伝子を安定に組込むことにより、菌体外グルコアララーゼが特に存在する麦芽汁中でのん粉 (デキストリン) を加水分解するためにビールの生産を高める。従つて、このシステムを用いることによつて高価な市販の酵素を添加することなく、非発酵性のでん粉の一部を発酵性の糖に、そしてアルコールに変換してビールを生産することが可能である。

< 実施例 1 >

酵母 CUP - 1 遺伝子の醸造酵母菌有 2 μ m プラスミドへの組込み

多 % α/β グルコースおよび 0.2 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加した NEP 培地中で後期定常期まで生育させてから非選択培地 (NEP , 2 多 % α/β グルコース加で $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含有せず) に移す。およそ 1 5 - 2 0 回の細胞分裂の後酵母細胞を集菌して NEP , 2 多 % α/β グルコース無培地に単コロニー分離のためまく。各コロニーにつき 0.2 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ および 1 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を添加した同培地にレプリカしてプラスミド pEHB 1 1 の存在を、また 2.0 多 % α/β ガラクトースおよび X - gal を添加した M 6 3 培地にレプリカして表現型を確認する。

その結果、プラスミド pEHB 1 1 はいずれのビール酵母に於いても不安定であり、コロニーの多くが銅感受性でかつ X-gal 上で青緑色を呈さない (β - ガラクトシダーゼ陰性) ことがわかった。この不安定性は非選択的に生育させた醸造酵母中の 2 μ m 型プラスミドとして予想されるものである。しかし、銅感受性 β - ガラクトシダーゼ陰性コロニー (pEHB 1 1 マイナス) および耐銅性 β - ガラクトシダーゼ陽性コロニー (pEHB 1 1 プラ

ス)の他に、0.2 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ に耐性を示すが、 β -ガラクトシダーゼを生産しないコロニーも少し得られた。この最後のタイプのコロニーを単離し、さらに調べた。遺伝解析の結果、これらのコロニーは β -ガラクトシダーゼも β -ラクタマーゼも生産することが出来なかつた。

銅耐性で β -ガラクトシダーゼ陰性の細胞を分子生物学的分析にかけた。酵母全DNAをCryerら(1975年)の方法により分離し、制限エンドヌクレアーゼEco RIおよびCla Iで消化した。消化および未消化DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分離してSouthernの方法(Maniatisら、1982年)によりニトロセルロースフィルターに移す。フィルターを前ハイブリダイゼーション緩衝液(5%のサケ精子DNA、10%のツシ血清アルブミン、10%のフィコル、10%のポリビニルピロリドン、0.1Mのグリソリンを含有する1.0Mの5.0% α/α ホルムアミド:100 mM リン酸緩衝液pH 6.5を5倍のSSC(0.15 M NaCl、0.015 Mクエン酸三ナトリウム、pH

7.0)中、42℃で1~2時間前ハイブリダイゼーションを行なつた後、 ^{32}P -デンプン標識DNAプローブを用いてDNA:DNAハイブリダイゼーションを行なう(Rigbyら、1977年)。DNA相同領域をオートラジオグラフィで同定する。CUP-1遺伝子(Hendersonら、1985)を含有するpBT13:1の1,25キロベース対のSau 3A断片とのハイブリダイゼーションの結果、銅耐性 β -ガラクトシダーゼ陰性クローンはプラスミドpBHB11を保有するビール酵母形質転換株で観察されるパターンと異なるハイブリダイゼーションパターンを示した。得られたハイブリダイゼーションパターンはpBHB11のCUP-1配列がビール酵母菌株の固有2 μ mプラスミドに組み込まれていることを示唆していた。さらに、未消化DNAとのハイブリダイゼーションの結果、銅耐性 β -ガラクトシダーゼ陰性クローンは、プラスミドpBHB11がおおよそ12.05キロベース対の大きさを有するのに対し、CUP-1遺伝子を含むおおよそ9.13キロベース対の小プラスミドを保有する

ことが確認され、これは2 μ m(6.3キロベース対)とpBHB11に存在する相同2 μ m DNAのくり返しの際に含有されるCUP-1配列の複合体である。

さらに全染色体DNAをE. coliのlacZ遺伝子および余分のE. coliプラスミドDNAを保有する ^{32}P 標識プラスミドpMC1403 DNA(Casadevallら、1980年)とハイブリダイゼーションした結果は、銅耐性 β -ガラクトシダーゼ陰性クローンはpBHB11が保有する異質的に全てのペクチリアDNA配列を欠損していることを示した。

CUP-1遺伝子のビール酵母2 μ mプラスミド中への組み込み部位はpBHB11の直列方向DNAくり返し配列が保有するDNA相同領域内であることがわかつた。これは全DNA制限酵素消化物をプラスミドpJDB110(Beggs、1981年)に由来する2138塩基対の ^{32}P 標識EcoRI-RindII断片でハイブリダイズして決定された。この2138塩基対断片は2 μ m B型のDNA複製開始点とコピ-の逆転くり返しDNA配列とを含有する。従つ

てCUP-1遺伝子が逆転くり返し的一方にすぐ隣接したDNA領域に組み込まれると、サザンハイブリダイゼーション後に見られる通常の制限パターンに乱れが生じる。サザントランスフアおよびハイブリダイゼーションと合せた標準の制限図作成により、挿入部位が2 μ m B型の塩基0のEco RI部位と塩基703のXba I部位に囲まれる703塩基対のDNA領域内に位置することがわかつた(Brosch、1981年)。

組み込みCUP-1遺伝子の安定な高コピー数維持

ビール酵母の銅耐性 β -ガラクトシダーゼ陰性クローンを、以後「組み込み体」と呼ぶ。この銅耐性表現型の遺伝的安定性を非選択条件下で生育させた後分析した。

組み込み体を単離し、2% α/α グルコースおよび0.2 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を含有する10%のYPD中で定常期まで増殖させる。遠心分離により酵母菌体を集め、洗滌液を含有しない新しい増地に移す。酵母を中期対数増殖期まで生育させ、新しい生育増地に移す。CUP-1遺伝子の存在はNEP、2%

×/μgグルコースを添加培地にプレートした後0.5 mM CuSO₄・7H₂Oを添加した同じ培地にレプリカすることにより選別した。このような非選択条件下での連続培養をおよそ100~130世代続ける。第2図に示す結果は銅耐性の表現型はこの期間中安定であることを示している。2 μm組換えプラスミド pET 13:1 で形質転換したビール酵母を用いて同じ実験を行なうと、かなりの程度の遺伝的不安定性が見られた(第2図)。さらに、適当に増強したDNAプローブ(上述)でのDNAハイブリダイゼーションによる組込み体の分子解析結果は、非選択条件下での連続的生育の後もCUP-1遺伝子が内生2 μmプラスミド中に維持されていることを示した。

醸造酵母は通常一コピーのCUP-1遺伝子を染色体上に5.2キロベース対Eco RI断片内に保有している。従つて組込み体ビール酵母中のCUP-1遺伝子の染色体外コピー数を、全酵母DNAのEco RI消化物を³²P標識CUP-1プローブ(pET 13:1からの1.25キロベース対のSau

3A断片; Hendersonら, 1985年)でプロベイングすることにより決定することが出来る。このようなハイブリダイゼーションの結果、5.2キロベース対の染色体CUP-1断片および内生2 μmプラスミドに組込まれたCUP-1遺伝子に由来する3.0キロベース対断片に相当する二本のDNA相同バンドが得られた。

二つのバンドを露光したオートラジオグラムのデントメータースキャンによる強度の比較で染色体遺伝子数に対比した染色体外CUP-1遺伝子のおよそのコピー数を見ることが出来る。このようにして、組込み体がCUP-1染色体遺伝子当りおよそ87コピーの染色体外CUP-1遺伝子を保有することが推定された。

酵母の再くり返し5SリボゾームDNA(Petesら, 1985年)に対するCUP-1遺伝子の相対強度比較によるという他の方法での染色体外CUP-1遺伝子のコピー数測定の結果組込み体では一倍体遺伝子当り55のコピー数が得られた。

pEHB11の一般2 μm組込みベクターとしての利用

プラスミドpEHB11は直列方向の703塩基対の相同くり返し内にCUP-1遺伝子の3'末端に隣接して(第1図)特徴的なKpn I制限エンドヌクレアーゼ部位を有する。この独特な部位はさらに新たなDNA配列、例えば「目的の遺伝子」を導入するのに都合良く、その結果うまく形質転換するとビール酵母の内生2 μmプラスミド中に組込むことが出来る。プラスミドpEHB11およびその独特なKpn Iクローニング部位を利用することにより、銅耐型CAL 10/CYC 1プロモーター・ミネーター発現カセットにより発現されるヒト血清アルブミン(HSA)遺伝子を選択的に組込むことが可能であり、その結果、調節されたHSA発現ユニットを高コピー数で安定に維持できる。これによりこの組込み遺伝子を保有するビール酵母が既に記載されている方法(ヨーロッパ特許出願№86303039.1)に従つて発酵工程後にHSA生産を誘導されると高レベルの遺伝子発現が

起る。

引用文献

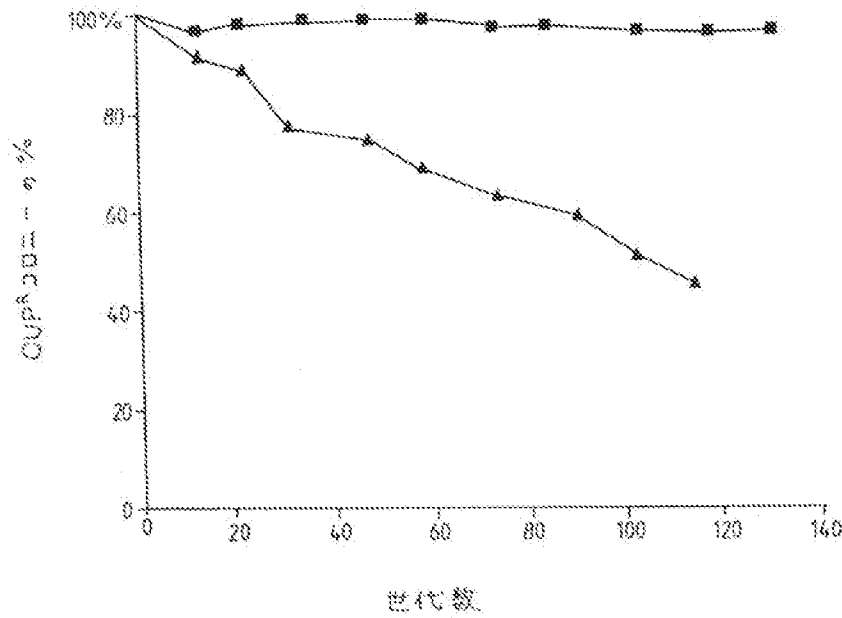
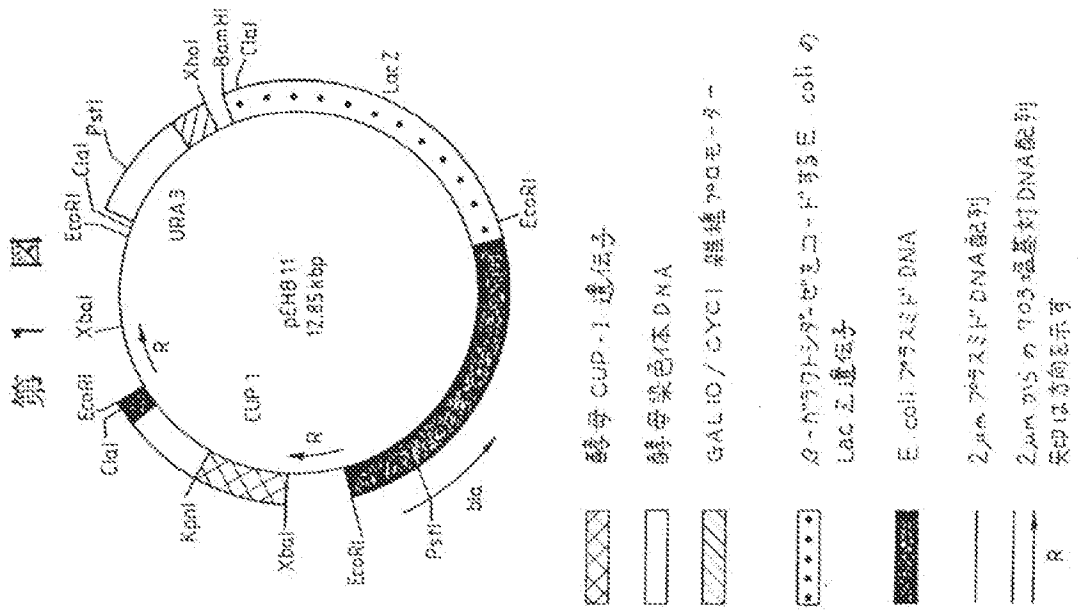
- Aigle et al., (1984), Journal of the American Society of Brewing Chemists, 42, 1.
 Beggs, (1978), Nature, 275, 104.
 Beggs (1981), In: "Molecular Genetics in Yeast" Alfred Benzon Symposium No.16, Munksgaard, Copenhagen.
 Broach (1981), In: "The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance", Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbor, N.Y., pp 445.
 Broach & Hicks, (1980), Cell, 21, 501.
 Casadaban et al., (1980), Journal of Bacteriology, 143, 971.
 Chevallier & Aigle, (1979), FEBS Letters, 108, 179.
 Clark-Walker & Miklos, (1974), European

- Journal of Biochemistry, 41, 359.
- Cohen et al., (1980). Proceeding of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1078.
- Cryer et al., (1975). In: "Methods in Cell Biology", 12, Academic Press, pp. 39-44.
- Falco et al., (1985). Nucleic Acids Research, 13, 4011.
- Gerbaud et al., (1979). Gene, 5, 233.
- Gritz et al., (1983). Gene, 25, 178.
- Hartley & Donaldson, (1980). Nature, 286, 860.
- Henderson et al., (1985). Current Genetics, 9, 133.
- Hicks et al., (1979). Cold Spring Harbour Symposium Quantitative Biology, 43, 1305.
- Hinchliffe & Box (1985). Proceeding of the European Brewery Convention Congress, 20th, Helsinki, 267.
- Hinchliffe & Daubney (1986). Journal of the American Society of Brewing Chemists, 44.
- Seligy et al., (1980). Nucleic Acids Research, 8, 3371.
- Sigurdson et al., (1981). Molecular and General Genetics, 183, 59.
- Struhl et al., (1979). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1035.
- Taketo et al., (1980). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 3144.
- Webster et al., (1983). Gene, 26, 245.
- 98.
- Hinnen et al., (1970). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 1929.
- Jimenez et al., (1980). Nature, 287, 849.
- Kikuchi, (1983). Cell, 35, 487.
- Livingston, (1977). Genetics, 86, 73.
- Livingston & Hahne, (1979). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.
- Maniatis et al., (1982). In: "Molecular Cloning a Laboratory Manual". Cold Spring Harbour.
- Nelson & Paugman, (1979). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 4815.
- Petes et al., (1978). Journal of Bacteriology, 134, 295.
- Rigby et al., (1977). Journal of Molecular Biology, 113, 237.

4. 図面の簡単な説明

第1図は pBB 11 の構成を示す模式図であり、第2図はラガー酵母菌株 BB 1 0.2 における CUP-1 の安定性を示すグラフである（ラガー酵母菌株 BB 1 0.2 の数規型の安定性。BB 1 0.2 [pBT 1 3 : 1], \longleftrightarrow ; BB 1 0.2 [組み込み体], $\bullet \longrightarrow$)。

代理人 後 村 昭



第 2 図

手続補正書(第)

昭和62年7月31日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和62年特許第159504号

2. 発明の名称

遺伝子の遺伝子修飾方法

3. 補正をする者

出願人の代表 特許出願人

氏 名

氏 名 デルタ バイオテクノロジー リミテッド

住所

4. 代理人

氏 名

〒100 東京都千代田区千代田二丁目2番1号

新 大 学 館 ビル デルタ 3 3 1

電 話 (211) 3 5 5 1 (代 表)

氏 名

(5655) 渡 村

5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明 細 書



8. 補正の内容 別紙のとおり

明細書の添付(内容に変更なし)

方 式

添 付

(特 許 庁)